

用 DNA 指纹图技术分析 Wistar 大鼠的遗传距离

陈振文¹, 李瑞生¹, 王承利², 赵林山³, 宋德光⁴, 王大鹏⁵

(1. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071; 2. 沈阳军区总医院实验动物中心, 沈阳 110015;
3. 哈尔滨市医科大学实验动物中心, 哈尔滨 150086; 4. 解放军军需大学实验动物中心, 长春 130062;
5. 海军总医院实验动物中心, 北京 100037)

摘要:采用 JL-02 多位点探针和 Southern 杂交对 Wistar 大鼠基因组进行了 DNA 指纹分析, 并对国内最具有典型的 6 个地区 9 个 Wistar 大鼠群体内和群体间进行了 DNA 指纹分析比较。结果表明, DNA 指纹图较好地反映了封闭群动物的遗传本质, 具有良好的多态性。同一群体不同个体间 Wistar 大鼠遗传距离主要为 0.2~0.6, 将不同群体的 Wistar 大鼠 DNA 指纹图带进行分析表明, 所有群体间的 DNA 指纹图的遗传距离在 0.2~0.7。

关键词: DNA 指纹图; Wistar 大鼠; 遗传距离

中图分类号: Q341

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2002)05-0275-04

Analysing Genetic Distance of National Wistar Rat with DNA Fingerprinting

CHEN Zhen-wen¹, LI Rui-sheng¹, WANG Cheng-li², ZHAO Lin-shan³,
SONG De-guang⁴, WANG Da-peng⁵

(1. Laboratory animal center, academy of military medical sciences, Beijing 100071, China;
2. Laboratory animal center, Military Total Hospital of Shenyang, Shenyang 110015, China;
3. Laboratory animal center, Medical university of Haerbin, Haerbin 150086, China;
4. Laboratory animal center, the quartermaster university of PLA, Changchun 130062, China;
5. Laboratory animal center, Naval Military Total Hospital of PLA, Beijing 100037, China)

Abstract: DNA fingerprinting of Wistar rat were studied with JL-02 Mulilocus probe and Southern hybridization, and comparing with different individuals of nine groups Wistar rat from six national classical area and different groups. It was indicated that DNA fingerprinting could reflect genetic material of outbred strain rat, and were more polymorphic. The genetic distances of Wistar rat were distributed for 0.2~0.6 among different individuals within same groups, and the genetic distances of Wistar rat were distributed for 0.2~0.7 among different groups.

Key words: DNA fingerprinting; wistar rat; genetic distance

封闭群动物是以非近亲交配方式繁殖生产的一个群体。对其群体实施遗传分析, 不但可掌握群体的遗传概貌, 控制近交系数上升, 而且通过群体内个体间和群体间的比较, 对实验动物的选择、实验结果分析, 以及封闭群动物的生产提供理论依据。本实验利用 DNA 指纹图可同时检测基因组中多个基因座, 具

有多态性和更全面反映基因组变异程度等特点, 采用 JL-02 多位点探针和 Southern 杂交对 Wistar 大鼠进行了 DNA 指纹分析^[1], 并对国内主要地区较大饲养单位的 Wistar 大鼠个体间和群体间进行了 DNA 指纹分析比较, 旨在建立 Wistar 封闭群大鼠遗传距离的分析方法和了解国内 Wistar 封闭群大鼠的遗传状况。

收稿日期: 2001-11-05; 修回日期: 2002-01-28

基金项目: 总后卫生部基金课题资助(98M116)

作者简介: 陈振文(1959-)男, 汉族, 研究员, 农学硕士, 兽医专业。Tel: (010)66948208 Email: czwen@sohu.com

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实 验 动 物

由北京(以下简称京)、上海(以下简称沪)、沈阳(以下简称沈)、广州(以下简称穗)、长春(以下简称长)和哈尔滨(以下简称哈)等 6 个地区提供的 9 个 Wistar 封闭群大鼠各随机抽取动物 6 只,雌雄各半,对所有动物不作质量级别和年龄要求,各单位动物均具有当地动物管理委员会颁发的实验动物质量合格证书。动物经脱颈法处死后取脑组织,-20℃ 保存。

1.1.2 试 剂

JL-02 多位点探针(公安部物证中心惠赠);蛋白酶 K(Merck 公司);

限制性内切核酸酶 *Hinf*I (TaKaRa 公司); ECL 试剂盒(Amersham 公司);

1.1.3 主 要 仪 器 设 备

电泳仪(Pharmacia)、杂交箱(Appligene)、台式高速离心机(Beckmen)、真空转移泵(Pharmacia)、紫外分光光度计(HITACHI 2000A)。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 基 因 组 提 取 与 酶 切

取大鼠脑组织约 0.1g,加入 EDTA-Na₂、10% SDS 和蛋白酶 K 混均,于 37℃ 水浴中消化 5h 以上,用酚/氯仿法提取 DNA,用紫外分光光度计测定其 OD260 和 OD280 值,计算其 DNA 浓度和纯度,然后每样品取 10~15μl DNA,加入限制酶(*Hinf*I)、10 倍缓冲液和纯水,37℃ 水浴消化 5~8h 进行完全酶切。

1.2.2 电 泳 与 转 移

0.6% 琼脂糖凝胶,在 20cm×24cm 电泳槽中 35V 电泳 18~24h,使 DNA 片段完全分离。然后采用真空转移法进行 DNA 脱嘌呤、碱变性、中和及将凝胶中的 DNA 片段原位转移至带正电荷的尼龙膜上。

1.2.3 杂 交 与 显 影 检 测

将转移完毕的尼龙膜正面朝里装入预杂交管中,注入预杂交液,42℃ 预杂交 1h,然后注入标记好的 JL-02 多位点探针,杂交 12h(42℃)以上。取出杂交完毕的尼龙膜分别用洗膜液 I 和洗膜液 II 振荡洗涤 2 次。采用化学发光法,将 ECL 显影液注到洗好的膜上,反应 1min,吸干置于暗盒中,在暗室内使 X 光片曝光 30min 以上,取出胶片,显影,定影。

1.2.4 统 计 方 法

采用群体遗传距离 phylitools 统计软件进行数据处理。

2 结 果

2.1 同一群体不同个体间 Wistar 大鼠遗传距离分析

采用 phylitools 软件对同一群体的 6 条 DNA 指纹图带进行分析,群体内不同个体间的遗传距离分布情况见表 1。综合 9 组同一群体不同个体间的遗传距离为 0.2~0.6,最高值在 0.4~0.5 之间(见图 1)。

表 1 同一群体不同个体间 Wistar 大鼠遗传距离

Table 1 Genetic distance within different individuals of same group Wistar

组别	遗传距离									
	0.1~0.2	0.2~0.3	0.3~0.4	0.4~0.5	0.5~0.6	0.6~0.7	0.7~0.8	0.8~0.9	0.9~1.0	1.0
组 1(长)			2	4	2	2	3	2		
组 2(京)	1	2	6	3	3					
组 3(哈)		2	5	4	2	2				
组 4(穗)	1	1	2	6	5					
组 5(京)			3	6	5	1				
组 6(京)	1	3	2	4	5					
组 7(沈)		2	2	7	2	1	1			
组 8(沪)			5	2	5	3				
组 9(京)		3	2	4	5	1				
合计	3	13	29	40	34	10	4	2	0	

2.2 不同群体个体间 Wistar 大鼠遗传距离分析

对不同群体个体间 Wistar 大鼠遗传距离进行分析,结果 9 组个体间的遗传距离主要在 0.2~0.7 之间,最高值在 0.5~0.6 之间(见表 2、图 2)。

表 2 不同群体 Wistar 大鼠遗传距离

Table 2 Genetic distance within different groups Wistar

组别	遗传距离									
	0.1~0.2	0.2~0.3	0.3~0.4	0.4~0.5	0.5~0.6	0.6~0.7	0.7~0.8	0.8~0.9	0.9~1.0	1.0
1~3 组	3	14	16	26	26	15	3	4	1	
4~6 组	5	13	17	22	26	17	4	4	0	
7~9 组	2	18	28	17	25	9	6	3	0	
合计	10	45	61	65	77	41	13	11	1	

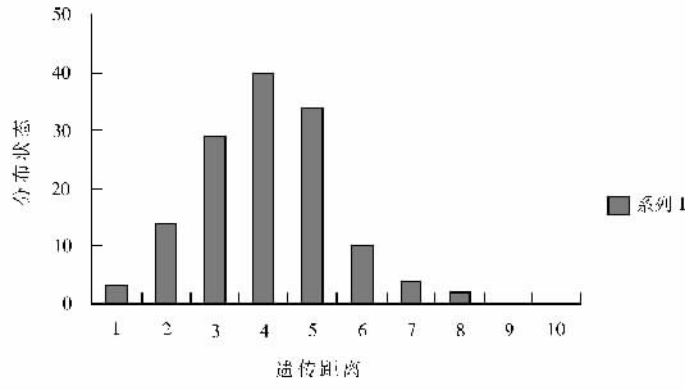


图 1 同一群体不同个体遗传距离分布图

注:1 为 0.1~0.2;2 为 0.2~0.3;3 为 0.3~0.4;4 为 0.4~0.5;5 为 0.5~0.6;6 为 0.6~0.7;7 为 0.7~0.8;8 为 0.8~0.9。

Fig. 1 Genetic distance within different individuals of same group

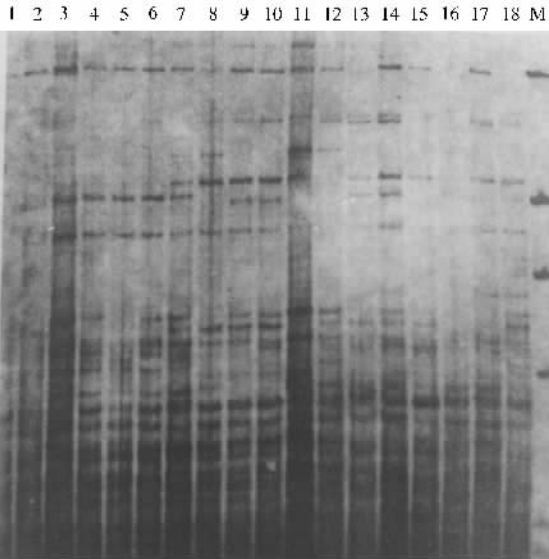


图 2 1~3 组 Wistar 大鼠 DNA 指纹图

注:1~6 为长春;7~12 为北京(1);13~18 为哈尔滨。

Fig. 2 Fingerprinting DNA within 1~3 groups Wistar

3 讨 论

3.1 关于动物群体遗传监控

封闭群 (closed colony) 动物又称远交群 (out-bred stock) 动物。是指以非近交方式繁殖生产的一个种群,在不从外部引入新血缘的条件下,至少连续繁殖 4 代以上的动物。封闭群动物遗传控制的关键是不从外部引进任何新的基因,保证“有效群体”足够大,且采取随机交配、随机留种,从而保持群体基因频率的稳定,防止近交系数上升太快。因此该群体既保持一般的遗传特性,而各个个体又具有杂合性^[2]。这就使封闭群动物的遗传分析遇到了困难。早期对自然群体遗传性变异的研究集中在易于检测或度量的变异型上,如形态变异型、染色体倒位及血型,这些研究虽然也很有意义,但它们不能对群体基因组的遗传变异总量作出估计^[3]。Lewontin 和 Hubby 及 Harris 在总结前人工作的基础上发现了一种遗传性变异的无偏估计方法,他们通过酶的电泳图谱研究一系列酶编码基因座的变异^[3]。他们和其他人的研究都表明:对一些酶位点,几乎每个种的遗传性变异都大量存在。由于这些研究似乎可以认为平衡观更准确地反映了决定酶结构的基因座所具有的变异。但从现在的观点来看,这种观点把问题过分简单化了。影响群体遗传变异的因素很多,如选择、突变、迁移、遗传漂变及交配体系等。要度量一个群体遗传性变异,最彻底最充分的资料应该是

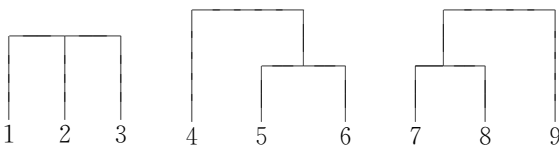


图 3 9 个群体的遗传距离分析图

注:1~2 组为 0.4594;1~3 组为 0.4964;2~3 组为 0.4938;
 4~5 组为 0.5215;4~6 组为 0.5309;5~6 组为 0.3271;
 7~8 组为 0.3782;7~9 组为 0.5012;8~9 组为 0.5128。

Fig. 3 Genetic distance within nine groups

群体中每个个体的 DNA 序列。Kreitmann 比较了果蝇不同品系的乙醇脱氢酶的核苷酸序列,结果核苷酸的 1.6% 有多态性^[4]。限制性片段长度多态性 (RFLP) 和随机扩增的多态性 DNA (RAPD) 技术也被广泛用于估计 DNA 序列水平上的变异^[5]。DNA 指纹技术已经广泛地应用于研究畜禽的品种或品系的遗传结构、胚胎移植或转基因个体的鉴别^[6]。本实验应用 JL-02 探针和 Southern 杂交对封闭群 Wistar 大鼠进行的 DNA 指纹图分析^[7~9], 结果在 2.0~23.1kb 之间各组的平均图带数在 20~29 条之间, 表明所覆盖的基因座之多是其他方法所无法比拟的。从各群体内个体之间的遗传距离大部分在 0.2~0.6 之间, 说明 DNA 指纹图较好地反映了封闭群动物的遗传本质。既有一定的相似稳定性, 又有一定的遗传离散杂合性。总之, DNA 指纹图在封闭群动物遗传概貌分析中具有有所反映的基因座多, 多态性好, 可供分析的图带多, 有较高的准确性和重复性, 结果易判读, 数据便于统计处理等特点, 可用于群体内和群体间的遗传变异分析。

3.2 国内 Wistar 大鼠遗传状况分析

封闭群动物具有类似于人类群体遗传异质性的遗传组成, 迄今为止, 对于封闭群的研究无论在理论上还是在实践上, 无论国内或国外都远远落后于对近交系的研究, 其原因在于封闭群应属于群体遗传学理论范畴, 不仅群体遗传学产生较晚, 而且该理论不能机械地套用于封闭群。封闭群大鼠由于其具有易饲养、繁殖率高、比近交系更接近自然种属的反应特点而广泛应用于教学、预实验、一般实验及药物筛选和安全评价等。Wistar 大鼠是世界上分布最广, 使用量最大的封闭群大鼠。我国饲养 Wistar 大鼠的单位较多, 一些较大饲养单位基本采取长时间自繁自养, 使其形成了各自遗传特性。有的由于群体过小或繁殖方式不当而造成近交系数过度上升或频繁引种而使其遗传变异增大。这些都造成了群体内和群体间的遗传同质和差异, 使动物间和群体间的可比性降低, 影响实验结果的准确性和重复性。本实验从全国最具有典型的 6 个地区 9 个 Wistar 大鼠群体中抽取动物, 经同一群体不同个体间的 DNA 指纹图带比较, 发现各个群体内动物间的遗传距离大部分在 0.2~0.6, 在 0.4~0.5 为最高, 说明群体内个体间遗传距离分布较为均匀, 个别群体遗传距离较近, 有近交系数过高的趋势。而群体间的遗传距离分布主要

在 0.2~0.7, 在 0.5~0.6 为最高, 说明其遗传分布大于群体内, 即遗传离散度升高。反映群体间的差异大于群体内个体差异, 但究竟其遗传距离在哪一数值范围内才是最佳封闭群状态。数值过高可能存在群体过小或繁殖方式不当而使近交系数过度上升。数值过低则可能表明引种过频、遗传变异(突变、迁移、漂变)或选择所造成, 用这样的动物进行实验, 其结果必然参差不齐、缺乏准确性和重复性。

Wistar 大鼠作为封闭群动物应存在一定的遗传变异性, 也就是说其等位基因存在一定的杂合性。但一个有足够大群体的封闭群之间理论上其相同等位基因频率应是一致的。原则上讲群体内个体间的差异与群体间的差异应趋于一致。但本实验经群体间的 DNA 指纹图比较结果显示群体间的差异远远超过群体内个体间的差异。而各个群体比较的结果亦有很大不同。这些都足以说明我国不同地区不同群体的 Wistar 大鼠的遗传物质存在一定差异。但这些差异产生的原因和是否对科学实验产生影响以及影响多大, 还需进一步研究确定。

参 考 文 献 (References):

- [1] 季安全, 李继周, 叶 健, 等. JL-02 多位点探针 DNA 指纹的法医学应用研究[J]. 中国法医学杂志, 1997, 12(2): 65~68.
- [2] 邹移海, 黄 韧, 连至诚, 等. 中医实验动物学[M]. 广州: 暨南大学出版社, 1999, 23~24.
- [3] 孔繁玲, 韩立新, 等. 群体遗传学导论[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993, 1~5.
- [4] Barysheva E V, Bukina A M, Limborskaia S A, *et al.* Analysis of genetic distances between populations using human DNA "fingerprints" detected by a phage M13 DNA probe[J]. Genetika, 1991, 27(9): 1493~1498.
- [5] Ponsuksili S, Wimmers K, Schmoll F, *et al.* Comparison of multilocus DNA fingerprints and microsatellites in an estimate of genetic distance in chicken[J]. J Hered, 1999, 90(6): 656~659.
- [6] Russell R J, Feating M F W, Deeny A A, *et al.* DNA fingerprinting for genetic monitoring of inbred laboratory rats and mice[J]. Laboratory Animal Science, 1993, 43(4): 460~465.
- [7] 陈振文, 李瑞生, 王冬平, 等. DNA 指纹图与生化标记在近交系小鼠遗传检测中的比较研究[J]. 中国兽医学报, 2001, (6): 627~630.
- [8] 李瑞生, 陈振文, 王承利, 等. 近交系大鼠 DNA 指纹分析研究[J]. 中国实验动物学报, 2001, (4): 196~200.
- [9] 董 罡, 陈振文, 陈 松, 等. JL-02 多位点探针 DNA 指纹在近交系小鼠遗传监测中的应用[J]. 遗传, 2001, 23(3): 226~228.